

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, A61K 49/00 G01N 33/577	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/16428 (43) Date de publication internationale: 31 octobre 1991 (31.10.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00323 (22) Date de dépôt international: 18 avril 1991 (18.04.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/05062 20 avril 1990 (20.04.90) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : IOVANNA, Juan-Lucio [IT/FR]; 151, traverse de la Gouffonne, Bât. D1, F-13009 Marseille (FR). KEIM, Volker [DE/DE]; Kirsch Blütenstrasse 33, D-6805 Heddesheim (DE). DA-GORN, Jean-Charles [FR/FR]; 77, bd du Redon, Bât. H., F-13009 Marseille (FR).		(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, bd Haussmann, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: ACUTE PANCREATITIS ASSOCIATED PROTEIN AND MEANS FOR THE DIAGNOSIS OF ACUTE PANCREATITIS

(54) Titre: PROTEINE ASSOCIEE A LA PANCREATITE AIGUE, MOYENS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PANCREATITE AIGUE

(57) Abstract

The invention concerns the family of the protein (PAP) associated with acute pancreatitis in humans and rats. It involves nucleotide fragments coding for the above-mentioned proteins. Also included for the purposes of the invention are antibodies recognizing the PAP and capable of being used in the diagnosis of pancreatitis. The invention is further aimed at producing PAP, in particular by genetic engineering.

(57) Abrégé

L'invention concerne la famille de la protéine (PAP) associée à la pancréatite aiguë chez l'homme et chez le rat. Elle vise aussi les fragments nucléotidiques codant pour les protéines ci-dessus. Entrent aussi dans le cadre de l'invention des anticorps reconnaissant la PAP et susceptibles d'être utilisés en vue du diagnostic de pancréatite. L'invention vise aussi la production de la PAP, notamment par génie génétique.

```

AAACCATCCAAATCGCCCGCAAGACAGCTAAGCAGGAGCAGAAAGATGATG 52
AGAGTTAAT ATG TTG CAT CGC TTG GCC TTC CCA CTC ATG 91
Met Leu His Arg Leu Ala Phe Pro Val Met

TCC TGG ATG CTG CTC TCC TGC CTG ATG CTC TTA TCA CAG 130
Ser Trp Met Leu Leu Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln

CTG CAA GGA GAA GAC TCT CCG AAG AAA ATA CCC TCT GCA 169
Val Gln Gly Glu Asp Ser Pro Lys Lys Ile Pro Ser Ala

CGC ATT AGT TGC CCC AAA GGC TCC CAG GCA TAT GGC TCC 208
Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Gln Ala Tyr Gly Ser

TAC TGC TAT GCC CTG TTT CAG ATA CCA CAG ACC TGG TTT 247
Tyr Cys Tyr Ala Leu Phe Gln Ile Pro Gln Thr Trp Phe

GAT GCA GAA CTG GCC TGC CAG AAG AGA CCT GAA GGA CAC 286
Asp Ala Glu Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Glu Gly His

CTT GYA TCT GTG CTC AAT GTA GCT GAA GCT TCA TTC TTG 325
Leu Val Ser Val Leu Asn Val Ala Glu Ala Ser Phe Leu

GCA TCC ATG GTC AAG AAC ACT GGA AAC AGC TAC CAA TAT 364
Ala Ser Met Val Lys Asn Thr Gly Asn Ser Tyr Gln Tyr

ACC TGG ATT GGA CTC CAT GAC CCC ACT CTT GGT GGA GAA 403
Thr Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu

CCC AAT GGA GGT GGA TGG GAG TGG AGT AAC AAT GAC ATA 442
Pro Asn Gly Gly Gly Trp Glu Trp Ser Asn Asn Asp Ile

ATG AAT TAT GTC AAC TGG GAG AGG AAC CTA TCT ACT GCC 481
Met Asn Tyr Val Asn Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ala

TTA GAC CGC GGA TTC TGT GGC AGC TTG TCA AGA TCT TCT 520
Leu Asp Arg Gly Phe Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser

GGA TTT CTA AGA TGG AGA CAT ACC ACA TGT GAA GTT GAA 559
Gly Phe Leu Arg Trp Arg Asp Thr Thr Cys Glu Val Glu

GTT GCC CTA CGT CTG CAA ATT TAC AGG TTA AAA TTA CCA 598
Val Ala Leu Arg Leu Gln Ile Tyr Arg Leu Lys Leu Pro

GAC AGC AAA CAG CTT T AGTTTCTCTGAAAGCAGCATCTGTCAAGGC 644
Asp Ser Lys Gln Leu

GCAGAAATATGAAGACTTCGCTAGAAAAAGTATATTCTATCTACAGTCCATAT 696
TGGAGCTCTAATCATCTTTAGCCAAATTTGTATTAAGTTGTGTCTCTCATGTC 748
TTGGAAGCAGTAAATAAACCTCAGTCTCTCTGAAAAAATAA 793

```

BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

PROTEINE ASSOCIEE A LA PANCREATITE AIGUE. MOYENS POUR LE DIAGNOSTIC DE LA PANCREATITE AIGUE.

La présente invention concerne des protéines associées à la pancréatite aiguë et des moyens pour le diagnostic de cette maladie.

La pancréatite aiguë est une affection inflammatoire du pancréas qui, sur le plan anatomo-pathologique, va de la simple forme oedémateuse à la nécrose hémorragique totale de la glande. La pancréatite nécro-hémorragique est une affection très grave, puisque l'estimation de sa mortalité varie de 30 % à 70 % selon les auteurs. Il est dans certains cas, très difficile d'établir avec certitude le diagnostic de pancréatite aiguë (Sarnier, M. et al, Gastroenterol. (1984), 13 : 865-870). Ce diagnostic repose avant tout sur l'examen clinique (douleur abdominale aiguë) sur le dosage d'un certain nombre de substances dans le plasma ou dans le liquide péritonéal (Bradley, J. et al, Br. J. Surg. (1981), 68 : 245-246 ; et Dubick, M. et al, Dig. Dis. Sci. (1987), 32 : 305-312). Parmi les dosages employés, on trouve ceux de l'amylase, de la lipase, de la trypsine, de l'élastase, de la ribonucléase, de la phospholipase A2, de l' α 2 macroglobuline, du calcium, de la LDH, des inhibiteurs de protéases et d'autres encore. Aucun d'entre eux ne s'avère pourtant spécifique, pratique, ni surtout discriminatif. On se contente donc en général de doser l'amylasémie. Récemment, l'échotomographie et la tomodensitométrie ont paru, dans certains cas, pouvoir faciliter le diagnostic de la pancréatite sans que le progrès ait été décisif (Silverstein, W. et al, Am.J. Roentgenol, (1981), 137 : 497-502).

Keim et al ont publié en 1984 (Digestion, (1984);, 29 : 242-249), des résultats sur les conséquences

d'une cannulation du canal pancréatique et de l'induction d'une pancréatite sur la composition protéique du suc pancréatique de rat, cet animal étant utilisé comme modèle expérimental. Après l'opération de cannulation (1 à 2 jours après), les auteurs ont observé une chute du taux d'amylase dans le suc pancréatique, puis 3 à 4 jours après l'opération, un retour au niveau normal d'amylase.

Une séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) des protéines du suc pancréatique pendant cette période de rémission, montrait une bande protéique supplémentaire, apparemment au plus tôt 12 heures après l'opération, et au plus tard, 3 à 4 jours après l'opération. Cette bande protéique n'existait pas chez le rat contrôle non traité. Cette protéine sécrétoire a été appelée PAP ("pancréatitis associated protein").

Par la suite, Keim et al ont effectué des mesures de la quantité de PAP présente dans le tissu pancréatique du rat après induction d'une pancréatite, au moyen de tests de détection de la fixation du complément.

Ces tests n'ont cependant pas permis jusqu'à présent de mettre en évidence l'existence de la PAP dans le sérum du rat chez lequel une pancréatite a été induite.

Les moyens proposés jusqu'à présent dans l'art antérieur n'avaient ainsi pas pu conduire à une identification suffisante de la protéine PAP chez le rat pour que le problème de l'intérêt d'une investigation chez l'homme, afin de rechercher si une telle protéine pouvait être détectée, soit posé.

De plus, les résultats disponibles jusqu'à présent, n'auraient pas permis d'envisager l'intérêt de la PAP pour réaliser un diagnostic d'une pancréatite.

Les inventeurs ont constaté que des anticorps polyclonaux de rat, reconnaissant la protéine PAP de rat, ne reconnaissaient pas de façon significative une protéine du sérum humain.

Après cette constatation, les inventeurs ont donc recherché une identification plus adéquate de la protéine PAP de rat, en vue de définir des outils d'investigation chez l'homme : les inventeurs ont maintenant clairement identifié la protéine PAP chez le rat et ils ont établi sa séquence en acides aminés. A partir de ces connaissances, ils ont élaboré des moyens qui pourraient permettre de détecter et d'identifier s'il existe une protéine correspondant à la PAP du rat, chez l'homme.

Le clonage et le séquençage de l'ARN messager PAP à partir d'une bibliothèque cDNA pancréatique de rat a aussi permis de démontrer sans ambiguïté que la PAP est bien synthétisée par le pancréas. Les inventeurs ont aussi montré que la protéine était très faiblement exprimée en l'absence d'inflammation pancréatique et fortement exprimée au cours de la pancréatite.

Compte tenu de la fragilité des malades atteints de pancréatite, il n'était pas concevable d'envisager de recueillir le suc pancréatique de ces malades, pour y rechercher la présence éventuelle d'une protéine PAP humaine (PAP-H).

Les inventeurs ont criblé une banque de cDNA pancréatique humaine, à l'aide d'un clone cDNA préalablement obtenu et correspondant à la PAP du rat.

Les inventeurs sont parvenus à isoler différents clones contenant des fragments d'ADNc susceptibles de

s'hybrider avec l'ADNc de la PAP de rat, ainsi qu'il est décrit ci-dessous.

La présente invention concerne donc des fragments d'ADNc capables de coder pour la protéine PAP de rat, ainsi que des fragments d'ADNc susceptibles de coder pour les protéines de la famille de la PAP humaine. L'invention vise aussi les protéines codées par ces fragments d'ADNc.

Elle se rapporte aussi à des vecteurs modifiés par intégration des susdits fragments d'ADNc, notamment pour l'expression de ces fragments.

L'invention vise aussi des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre la protéine PAP notamment la PAP humaine, ainsi que leur utilisation dans des procédés faisant appel à l'imagerie médicale, ou comme moyen pour le diagnostic de la pancréatite aiguë dans des kits et des procédés de diagnostic in vitro.

Une première famille de fragments d'ADN selon l'invention comprend donc les fragments d'ADNc codant pour la PAP de rat.

Appartiennent à cette famille, des fragments d'ADNc caractérisés en ce qu'ils répondent à la séquence nucléotidique S1 suivante codant pour la protéine PAP de rat, à une partie ou à une variante de cette séquence dès lors que cette partie ou variante code pour une protéine ou un peptide reconnu par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat, ou qu'elle hybride avec la séquence S1 dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C et après un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°.

Séquence S1 :

10	20	30	40	50	60
AAAACCATCC	AAATCGCCCG	CAAGACAGCT	AAGGAGGAGC	AGAAAGATGA	TGAGAGTTAA
70	80	90	100	110	120
TATGTTGCAT	CGCTTGGCCT	TCCCAGTCAT	GTCCTGGATG	CTGCTCTCCT	GCCTGATGCT
130	140	150	160	170	180
CTTATCACAG	GTGCAAGGAG	AAGACTCTCC	GAAGAAATA	CCCTCTGCAC	GCATTAGTTG
190	200	210	220	230	240
CCCCAAAGGC	TCCCAGGCAT	ATGGCTCCTA	CTGCTATGCC	CTGTTTCAGA	TACCACAGAC
250	260	270	280	290	300
CTGGTTTGAT	GCAGAACTGG	CCTGCCAGAA	GAGACCTGAA	GGACACCTTG	TATCTGTGCT
310	320	330	340	350	360
CAATGTAGCT	GAAGCTTCAT	TCTTGGCATC	CATGGTCAAG	AACACTGGAA	ACAGCTACCA
370	380	390	400	410	420
ATATACCTGG	ATTGGACTCC	ATGACCCAC	TCTTGGTGA	GAACCCAATG	GAGGTGGATG
430	440	450	460	470	480
GGAGTGGAGT	AACAATGACA	TAATGAATTA	TGTCAACTGG	GAGAGGAACC	CATCTACTGC
490	500	510	520	530	540
CTTAGACCGC	GGATTCTGTG	GCAGCTTGTG	AAGATCTTCT	GGATTCTAA	GATGGAGAGA
550	560	570	580	590	600
TACCACATGT	GAAGTTGAAG	TTGCCCTACG	TCTGCAAAAT	TACAGGTTAA	AATTACCAGA
610	620	630	640	650	660
CAGCAACACG	CTTTAGTTTG	TCCCTGAAGCA	CATCCTGTCA	AGGGGCAAAA	TATGAAGACT
670	680	690	700	710	720
TGCGTAGAAA	AAGTGATTTC	TATCTACAGT	CCATATTGGA	GCTCTAATCA	TTCTTTAGCC
730	740	750	760	770	780
AATTTTGAT	AAGTTGTGTC	CTCATGTCTT	GGAAAGCAGT	AATAAACCTC	AGTCTCTCTT
790	800	810	820	830	840
CGAAAAAAA	AAA				

Il est précisé que les abréviations ci-dessus ont les significations suivantes : 1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium ; 50 x Denhart = 5g Ficoll, 5g polyvinylpyrrolidone, 5g sérum albumine bovine dans 500 ml d'eau ; SDS : dodecylsulfate de sodium ; EDTA ; éthylène diamine tétraacétate de sodium.

Des anticorps polyclonaux dirigés contre la PAP de rat sont produits selon les techniques classiques ; de tels anticorps ont par exemple été décrits par Keim et al (Clin. Physiol. Biochem., 4 : 136-142 (1986)).

Un fragment d'ADNC appartenant à la première famille d'acides nucléiques de l'invention, est encore caractérisé en ce qu'il code pour une protéine répondant à une des séquences d'acides aminés A1 (séquence d'acides aminés de la protéine comprenant le peptide signal) ou A2 (séquence d'acides aminés de la protéine mature) suivantes ou pour une séquence d'acides aminés ayant une homologie de 40 à 80 % de préférence de 50 à 60 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés des séquences A1 ou A2.

Séquence A1 :

7

MetLeuHisArgLeuAlaPheProValMetSerTrpMetLeuLeuSerCysLeuMetLeuLeuSerGlnValGln
GlyGluaspSerProLysLysIleProSerAlaArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr
CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis
LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln
TyrThrTrpIleGlyLeuHisaspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyGlyTrpGluTrpSerAsnAsn
AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer
ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg
LeuLysLeuProaspSerLysGlnLeu

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Séquence A2 :

8

GluAspSerProLysLysIleProSerAlaArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr
CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis
LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln
TyrThrTrpIleGlyLeuHisAspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyGlyTrpGluTrpSerAsnAsn
AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer
ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg
LeuLysLeuProAspSerLysGlnLeu

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Une seconde famille de fragments d'ADN selon l'invention comprend des fragments d'ADNc d'une protéine PAP humaine, tels qu'obtenus par la mise en oeuvre des étapes suivantes :

- un premier criblage d'une bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine, ledit ADNc humain étant inséré dans un vecteur de clonage approprié, comprenant l'hybridation avec des sondes constituées par l'ADNc de la protéine PAP du rat, dans une solution constituée par : 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C suivie d'un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°C,
- la sélection des clones positifs d'ADNc humain ayant hybridé lors du criblage avec l'ADNc de la protéine PAP de rat, ces clones étant dits positifs,
- un deuxième criblage avec une séquence d'ADNc d'une protéine PSP dans les conditions d'hybridation ci-dessus avec un rinçage en présence de 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, pendant 2 heures à 65°C, afin d'éliminer les clones non spécifiques de l'ADNc de PAP humaine ayant cependant hybridé avec l'ADNc de PAP de rat et
- la récupération des clones n'ayant pas hybridé avec l'ADNc PSP,
- la récupération des fragments d'ADNc des clones positifs obtenus.

Un vecteur de clonage particulièrement avantageux pouvant être modifié par l'ADNc humain pour la réalisation de la bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine, est le vecteur λgt10.

La PSP est une protéine qui présente certaines analogies structurales avec la PAP de rat. Cette protéine a été décrite par Giorgi et al, J. Clin. Invest. (1989), 84, 100-106.

Les fragments d'ADNc ainsi définis sont caractéristiques de la famille de protéines comprenant la protéine PAP humaine.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, des fragments préférés d'ADNc sont tels qu'obtenus par la mise en oeuvre des étapes précédentes auxquelles est ajoutée l'étape suivante, avant la récupération des fragments d'ADNc des clones positifs obtenus : criblage avec l'ADNc de PAP de rat dans des conditions d'hybridation telles que celles décrites ci-dessus, avec un rinçage pendant 2 heures à 65°C.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, un fragment d'ADNc codant pour la PAP humaine répond à l'enchaînement S3 suivant :

ATG CTG

CCT CCC ATG GCC CTG CCC AGT GTA TCT TGG ATG CTG CTT
TCC TGC CTC ATG CTG CTG TCT CAG GTT CAA GGT GAA GAA
CCC CAG AGG GAA CTG CCC TCT GCA CGG ATC CGC TGT CCC
AAA GGC TCC AAG GCC TAT GGC TCC CAC TGC TAT GCC TTG
TTT TTG TCA CCA AAA TCC TGG ACA GAT GCA GAT CTG GCC
TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAC CTG GTG TCT GTG CTC
AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG AAG
AGC ATT GGT AAC AGC TAC TCA TAC GTC TGG ATT GGG CTC
CAT GAC CCC ACA CAG GGC ACC GAG CCC AAT GGA GAA GGT
TGG GAG TGG AGT AGC AGT GAT GTG ATG AAT TAC TTT GCA
TGG GAG AGA AAT CCC TCC ACC ATC TCA AGC CCC GGC CAC
TGT GCG AGC CTG TCG AGA AGC ACA GCA TTT CTG AGG TGG
AAA GAT TAT AAC TGT AAT GTG AGG TTA CCC TAT GTC TGC
AAA GTT CAC

L'invention vise aussi le fragment d'ADNc S4 qui comprend la séquence S3 ainsi que les enchaînements d'ADN suivants respectivement à ses extrémités NH₂ - et COOH - terminales :

cgggagagtgcactcctgattgcctcctcaagtcgcagacact

et, tgactagtgcaggagggaagtcagcagcctgtgtttggt
gtgcaactcatcatgggcatgagaccagtgtgaggactcaccctggaagaga
atattogcttaattccccaacctgaccacctcattctttatctttctctgt
ttcttctcccgctagtcatttcagtcctcttcattttgtcatacggcctaa
ggctttaagagcaataaaatttttagtctgcaaaaaa

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'ADNc de la PAP humaine est caractérisé en ce qu'il code pour la protéine répondant à la séquence d'acides aminés A3 suivante : Met Leu

```

aminés A3 suivante :
Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu
Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu
Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro
Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu
Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala
Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu
Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys
Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu
His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly
Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala
Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His
Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp
Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys
Lys Val His

```

Selon une autre définition, des fragments d'ADNc de la deuxième famille, un fragment d'ADNc selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant une homologie d'au moins 60 %, de préférence d'au moins 70 % avec au moins un enchaînement d'environ 100 nucléotides, compris dans la séquence S2 suivante caractéristique de l'ADNc de la PAP mature de rat, ou dans la séquence S3 donnée ci-dessus et caractéristique d'un fragment d'ADNc de PAP humaine.

Séquence S2 :

GAAGACT	CTCCGAAGAA	AATACCCCTCT	GCACGCATTA	GTTGCCCCCAA	AGGCTCCCAG
70	80	90	100	110	120
GCATATGGCT	CCTACTGCTA	TGCCCTGTTT	CAGATACCAC	AGACCTGTTT	TGATGCAGAA
130	140	150	160	170	180
CTGGCCCTGCC	AGAAGAGACC	TGAAGGACAC	CTTGTATCTG	TGCTCAATGT	AGCTGAAGCT
190	200	210	220	230	240
TCATTCTTGG	CATCCATGGT	CAAGAACACT	GGAACACAGCT	ACCAATATAC	CTGGATTGGA
250	260	270	280	290	300
CTCCATGACC	CCACTCTTGG	TGGAGAACCC	AATGGAGGTG	GATGGGAGTG	GAGTAACAAT
310	320	330	340	350	360
GACATAATGA	ATTATGTCAA	CTGGGAGAGG	AACCCATCTA	CTGCCCTTAGA	CCGGGATTC
370	380	390	400	410	420
TGTGGCAGCT	TGTCAAGATC	TTCTGGATT	CTAAGATGGA	GAGATACCAC	ATGTGAAGTT
430	440	450	460	470	480
GAAGTGCCC	TACGTCTGCA	AATTACAGG	TTAAAAATTAC	CAGACAGCAA	ACAGCTT

L'invention vise aussi des fragments d'ADNc codant pour la PAP humaine caractérisés par leur capacité d'hybridation avec la séquence nucléotidique S1 caractéristique de l'ADNc de la PAP de rat, et/ou avec la séquence nucléotidique S2 caractéristique de l'ADNc de la PAP mature de rat, dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C et avec un rinçage dans une solution comprenant 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois pendant 15 minutes à 65°C.

Un fragment d'ADNc de la PAP humaine particulièrement préféré dans le cadre de la présente demande, est caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique suivante:

10	20	30	40	50	60
TTTGTTAAGG	ATTCCCTTGA	GAATTATGTA	AAAGTTTAC	AAGAGTCCAT	CTCATTTCTCT
70	80	90	100	110	120
TTGTCCCCCT	CAAAGCTGGC	TTGCCAGAAG	CGGCCCTCTG	GAAAACTGGT	GTCTGTGCTC
130	140	150	160	170	180
AGTGGGGCTG	AGGGATCCTT	CGTGTCCTCC	CTGGTGAGGA	GCATTAGTAA	CAGCTACTCA
190	200	210	220	230	240
TACATCTGGA	TTGGGCTCCA	TGACCCACAC	CAGGTGCGAG	TATATCCTCC	CCTCTCTGTT
250	260	270	280	290	300
ACCTCTCAAG	GTACTGTTGT	TGCCCAGGCG	CACTCCCTGT	CCCCAGTCCC	TGCCCAGGAA

GTACTT

Les inventeurs ont constaté que la séquence protéique déduite de cette séquence nucléotidique humaine présente certaines homologies avec la séquence codant pour la protéine PAP de rat, bien que la seule connaissance jusqu'à présent des anticorps dirigés contre la PAP de rat ne permettait pas de détecter la protéine PAP humaine dans un échantillon biologique donné.

L'identification d'un fragment d'ADNc codant pour la protéine PAP humaine permet maintenant d'envisager la production de cette protéine, notamment par voie de génie génétique, ainsi que l'obtention d'anticorps, utilisables en tant que moyens de diagnostic d'une pancréatite aiguë.

L'invention concerne également un fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il s'agit du fragment d'ADN complémentaire des fragments d'ADNc ci-dessus définis, ou encore en ce qu'il s'agit du fragment d'ARN correspondant à ces ADNc.

L'invention vise aussi tout fragment de séquence nucléotidique codant pour la PAP humaine, susceptible d'être utilisé comme sonde, après un marquage approprié dudit fragment, en vue de réaliser la détection l'acide nucléique caractéristique de la PAP humaine dans un échantillon biologique.

L'invention concerne également la protéine PAP humaine telle qu'obtenue par l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, tel que défini ci-dessus, au moyen d'un système d'expression adapté, par exemple un hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression, lui-même modifié par l'insertion du susdit fragment d'ADNc de la PAP humaine.

Une protéine PAP humaine particulière selon l'invention est une protéine telle qu'obtenue par

l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, inséré en phase dans un vecteur pEX, dans E.coli, notamment dans E.coli souche pop2136.

Des protéines PAP humaines selon l'invention sont aussi caractérisées en ce que leurs séquences d'acides aminés présentent une homologie d'au moins 50%, de préférence d'au moins 60% et de façon très préférée d'au moins 70 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés, compris dans la séquence A2 de la protéine PAP de rat mature, ou dans la séquence A3 de la protéine PAP humaine ci-dessus décrite.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la protéine PAP humaine répond à la séquence A3 donnée dans les pages précédentes.

L'invention vise aussi tout fragment de la séquence A3 dès lors qu'il est reconnu par des anticorps reconnaissant cette séquence, notamment des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la séquence A3.

La protéine PAP humaine peut être produite par les techniques du génie génétique ou encore par purification, par exemple par chromatographie, à partir d'un échantillon biologique la contenant .

Selon une définition particulière de l'invention, la protéine PAP humaine répondant aux définitions précédentes, comprend la séquence d'acides aminés suivante :

	16	
Phe Val Lys Asp Ser Leu Glu Asn Tyr Val Lys Val Leu	39	13
Gln Glu Ser Ile Ser Phe Ser Leu Ser Pro Ser Lys Leu	78	26
Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val	117	39
Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val	156	52
Arg Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly	195	65
Leu His Asp Pro Thr Gln Val Arg Val Tyr Pro Pro Leu	234	78
Ser Val Thr Ser Gln Gly Thr Val Val Ala Gln Ala His	273	91
Ser Leu Ser Pro Val Pro Ala Gln Glu Val Leu	306	102

Entre également dans le champ de la présente invention, la protéine PAP de rat caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés A2 ci-dessus, ou une variante ou une partie de cette séquence dès lors que cette partie ou cette variante est reconnue par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat ou qu'elle présente une homologie d'au moins 50 %, de préférence d'au moins 60 % avec la séquence A2 de PAP de rat ci-dessus, ou avec la séquence A3 de la PAP humaine.

L'invention vise aussi la protéine PAP de rat, répondant à la séquence A1 ou à une variante de A1 présentant les caractéristiques définies ci-dessus vis-à-vis de la séquence d'acides aminés A2.

Chez le rat la PAP est présente en très faible quantité au niveau d'un pancréas humain normal, et sa synthèse peut être considérablement augmentée en cas de pancréatite aiguë jusqu'à un niveau d'environ 50 à 100 fois supérieur à celui qui existe dans le pancréas normal.

La protéine PAP de rat subit une augmentation de son taux dans le suc pancréatique lors d'une pancréatite aiguë, alors que le taux des autres enzymes diminue.

De plus, dans la pancréatite, toutes les protéines sécrétoires pancréatiques passent dans le sang. Par conséquent, la mise en oeuvre dans le sang ou dans un autre échantillon biologique d'un patient humain (par exemple l'urine ou le liquide péritonéal), du dosage de la protéine PAP dont la synthèse est considérablement augmentée en cas de pancréatite, laisse supposer que l'on aura un différentiel normal/pathologique, beaucoup plus important que lors des tests habituellement utilisés pour la détection, et donc beaucoup plus facilement décelable.

L'invention se rapporte aussi dans ce but à des anticorps caractérisés en ce qu'ils reconnaissent la protéine PAP humaine précédemment définie, ces anticorps pouvant être soit polyclonaux soit monoclonaux.

Des anticorps monoclonaux sont par exemple des anticorps tels que produits par un hybridome préalablement formé par fusion d'une cellule de myélome avec une cellule splénique d'un animal préalablement immunisé avec une protéine PAP humaine.

L'invention concerne aussi les hybridomes formés par fusion de cellules de myélome et de cellules spléniques d'animal préalablement immunisé avec la protéine PAP humaine, notamment avec la protéine correspondant à l'enchaînement d'acides aminés A3.

Des anticorps monoclonaux particulièrement avantageux dans le cadre de l'invention, sont ceux qui reconnaissent de façon spécifique la partie NH₂ - terminale de la PAP humaine. Des anticorps particuliers

sont également définis en ce qu'ils reconnaissent la PAP humaine et ce qu'ils sont dépourvus de réaction immunologique avec les autres lectines.

A titre d'exemple, un anticorps monoclonal intéressant notamment pour la détection de la PAP humaine est un anticorps monoclonal dirigé contre le peptide suivant de la PAP humaine : Glu Glu Pro Gln Arg. Pour suivre ce peptide dans des tests de détection de la PAP humaine on a par exemple ajouté un résidu tyrosine sur l'arginine de façon à rendre possible le marquage à l'Iode selon les techniques habituelles de marquage.

L'invention concerne aussi des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre les déterminants antigéniques des anticorps de l'invention reconnaissant la PAP humaine.

D'autres anticorps selon l'invention sont des anticorps monoclonaux qui reconnaissent la protéine PAP de rat.

Un protocole d'immunisation d'animaux choisis, notamment de souris ou de lapins, pour la mise en oeuvre de l'invention, est le protocole décrit par Kohler et Milstein, Nature (1975), 256, 495-497.

Entre également dans le cadre de l'invention, un vecteur d'expression et/ou de clonage, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN choisi parmi les fragments précédemment définis.

Des vecteurs d'expression et/ou de clonage particulièrement avantageux pour la mise en oeuvre de l'invention comprennent le plasmide d'expression pEX capable d'exprimer l'ADNc de la protéine PAP humaine dans une bactérie, par exemple E.coli.

D'autres vecteurs sont choisis en fonction de l'hôte chez lequel on recherche l'expression. A cet

égard, il peut s'agir pour les cellules de mammifères, d'un vecteur de type baculovirus.

L'invention se rapporte également à un hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression tel que précédemment défini, dans des conditions permettant l'obtention de la protéine ou du peptide codé par le fragment d'ADN de l'invention, inséré dans ce vecteur.

A titre d'exemple, des hôtes cellulaires formant un système d'expression adéquat pour les fragments d'ADN de l'invention, sont des bactéries telles que E.coli, notamment la souche pop2136.

L'invention concerne également le produit d'expression de l'hôte cellulaire transformé selon ce qui précède.

Avantageusement on choisira d'exprimer le fragment d'ADN selon l'invention dans un hôte procaryote ou eucaryote en fonction du produit que l'on souhaite avoir s'agissant notamment de sa glycosylation.

A titre d'exemple, des hôtes cellulaires intéressants pour la mise en oeuvre de l'invention, sont des bactéries, par exemple E.coli, des levures, des cellules d'insectes ou de mammifères, par exemple des cellules CHO.

La présente invention concerne également des compositions, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un anticorps choisi parmi ceux qui ont été précédemment définis, dirigés contre la protéine PAP humaine. Une telle composition peut être une composition pour le diagnostic in vitro, pour la mise en oeuvre sur un échantillon biologique tel que le sang, l'urine ou le liquide péritonéal d'un patient manifestant des symptômes de la pancréatite aiguë.

Les anticorps utilisés seront le cas échéant marqués par des marqueurs chimiques adaptés.

L'invention vise aussi un kit pour le diagnostic in vitro de la pancréatite aiguë à partir d'un échantillon biologique déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend:

- au moins un anticorps choisi parmi les précédents capable de détecter la présence d'un antigène de type PAP humaine dans ledit échantillon biologique, lesdits anticorps étant marqués,
- selon la nature du marquage, un réactif pour détecter la présence d'un complexe du type antigène-anticorps spécifique,
- un témoin négatif.

De préférence les anticorps mis en oeuvre sont spécifiques de la PAP humaine dès lors qu'ils sont dépourvus de réaction avec les autres lectines connues.

Pour effectuer le marquage des anticorps selon l'invention, on pourra avoir recours par exemple à des radioisotopes, à des marqueurs chimiques ou enzymatiques, à des marqueurs chimioluminescents.

L'invention se rapporte par ailleurs à un procédé pour détecter in vitro une pancréatite aiguë à partir d'un échantillon biologique comprenant les étapes de:

- mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir la PAP humaine avec des anticorps dirigés contre la PAP humaine,
- détection de la réaction antigène-anticorps entre les susdits anticorps et la PAP humaine.

L'invention vise aussi l'utilisation des anticorps dirigés contre la PAP le cas échéant sous forme de composition comprenant plusieurs anticorps marqués, pour la visualisation en imagerie médicale de la glande pancréatique, l'anticorps étant au préalable marqué à l'aide d'un radioisotope ou d'un marqueur chimique ou enzymatique.

La visualisation peut permettre de déceler la présence de PAP humaine.

A cet égard, l'invention vise un procédé d'observation de la glande pancréatique caractérisé par :

- l'injection à un patient d'une composition ci-dessus, dans des conditions physiologiquement acceptables,
- l'observation d'une réaction entre les anticorps contenus dans la susdite composition et la PAP humaine lorsqu'elle est présente.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples et les figures qui suivent :

- figure 1 : Expression de la PAP et de l'amylase au cours de la pancréatite aiguë expérimentale du rat. Analyse par "Northern blot" - charge par piste : 30 µg ARN total, le même filtre a été utilisé successivement pour PAP et Amylase. Sondes : cDNA PAP (environ 800 bp) et Amylase (environ 1100 bp), marquées au ³²P avec une activité spécifique d'environ 2x10⁹ cpm/mg.
- on a observé les phénomènes suivants : induction de l'expression du gène pap (12 heures -48 heures) (phase aiguë) ; suppression de l'induction durant la récupération (5-10 jours) ; au contraire, l'amylase baisse durant la phase aiguë.
- figure 2 : Séquence nucléotidique codant pour la PAP de rat, et la séquence d'acides aminés correspondante.
- figure 3 : Fragment de la séquence nucléotidique codant pour la PAP humaine, et la séquence d'acides aminés correspondante.
- figure 4 : Séquence nucléotidique (S4) caractéristique de la PAP humaine dont la séquence codante S4, et la séquence d'acides aminés (A3) qui lui correspond.

1. Construction d'une bibliothèque DNAc pancréatique de rat dans le vecteur λ gt11.

Préparation de l'ARN pancréatique de rat : la préparation a été réalisée en suivant exactement la technique de Chirgwin, J.M., et al, Biochemistry (WASH) (1979), 19, 5294-5299. La fraction des ARN messagers de cet ARN total a été séparée par chromatographie sur colonne d'oligo-dT cellulose selon la technique de Aviv, H. et Leder, P., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, (1972), 69, 1408-1412.

Préparation du cDNA : l'ADNc pancréatique a été synthétisé à l'aide du kit commercialisé par Amersham France S.A. (code RPN 1256), en suivant exactement les recommandations du fabricant.

Construction de la bibliothèque : la bibliothèque a été construite dans le vecteur d'expression λ gt11 à l'aide du kit commercialisé par Amersham France S.A. (code RPN 1280), en suivant exactement les recommandations du fabricant.

2. Construction d'une bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine dans le vecteur λ gt10.

Préparation d'ARN pancréatique humain et synthèse de l'ADNc correspondant aux ARN messagers : des fragments de pancréas normal provenant de donneurs d'organe en coma dépassé ont été traités comme décrit ci-dessus pour le pancréas de rat.

Construction de la bibliothèque : la bibliothèque a été construite dans le vecteur de clonage λ gt10 à l'aide du kit commercialisé par Amersham France S.A. (code RPN 1257), en suivant les recommandations du fabricant.

3. Criblage de la bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine avec un clone exprimant la PAP de rat.

A partir de la bibliothèque d'ADNc pancréatique de rat construite selon la méthode ci-dessus, on a sélectionné un clone reconnu par des anticorps polyclonaux dirigés contre la PAP de rat.

L'ADNc de ce clone de PAP de rat a été isolé et utilisé en tant que sonde pour cribler la banque d'ADNc pancréatique humaine obtenue dans λ gt10, telle que décrite ci-dessus.

Dans un premier temps, le criblage a été réalisé dans les conditions de stringence suivantes 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 μ g ADN de sperme de saumon, 18 heures à 68°C avec un rinçage dans 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois pendant 15 minutes à 65°C. Ceci permet d'obtenir environ 80 clones d'ADNc humain.

Ensuite on a réalisé un criblage avec l'ADNc PSP, dans le but d'éliminer les clones non caractéristiques de la PAP humaine, qui étaient cependant capable d'hybrider avec l'ADNc de la PAP de rat dans les conditions ci-dessus: on a récupéré environ 50 clones qui comportent donc un fragment d'ADNc codant pour une protéine ou un polypeptide appartenant à la famille de la protéine PAP humaine.

Parmi ces clones on a sélectionné ceux dont l'ADNc présente la plus forte homologie avec la protéine PAP de rat, en réalisant un second criblage au moyen de l'ADNc de PAP de rat dans des conditions de stringence suivantes 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 μ g ADN de sperme de saumon, 18 heures à 68° avec un rinçage dans 6 x SSC, 0,1 % SDS, pendant 2 heures à 65°C. On a ainsi sélectionné 9 clones positifs.

4. Séquençage des clones sélectionnés

Les insertions des clones intéressants ont été sous-clonées dans les phages M13mp18-M13mp19 comme décrit dans "Molecular Cloning, a laboratory manual"

Sambrook , J., Fritsch, E.F., et Maniatis T. eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990). Le séquençage des phages M13 recombinants a été réalisé par la technique décrite par Sanger F. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1977), 74, 5463-5467, en utilisant l'amorce universelle commercialisée par Amersham (code N4511).

5. Expression d'un fragment de PAP dans E.coli à l'aide du plasmide d'expression pEX et préparation d'anticorps contre la protéine hybride.

Un kit d'expression faisant appel au plasmide pEX dans E. coli, commercialisé par la société Genofit sous la référence G2104, a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. Des fragments de restriction correspondant à la séquence codante de la protéine ont été insérés dans le plasmide pEX. Les plasmides recombinants ont servi à transformer des bactéries (E. coli souche pop 2136). Les protéines des bactéries recombinantes ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %. La bande protéique correspondant à la PAP hybride a été découpée, homogénéisée dans de l'adjuvant de Freund et injectée à des lapins à raison de 3 injections par lapin à 3 semaines d'intervalle, chaque injection contenant environ 20 µg de protéine hybride. Le sang des lapins a ensuite été prélevé et les immunoglobulines G purifiées sur colonne de protéine A-Sepharose (Pharmacia-France).

R E V E N D I C A T I O N S

1. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine, tel qu'obtenu par la mise en oeuvre des étapes suivantes :

- un premier criblage d'une bibliothèque d'ADNc pancréatique humaine, ledit ADNc humain étant inséré dans un vecteur de clonage approprié, comprenant l'hybridation avec des sondes constituées par l'ADNc de la protéine PAP du rat, dans une solution constituée par : 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C, suivie d'un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°C,
- la sélection des clones positifs d'ADNc humain ayant hybridé lors du criblage avec l'ADNc de la protéine PAP de rat, ces clones étant dits positifs,
- un deuxième criblage avec une séquence d'ADNc d'une protéine PSP dans les conditions d'hybridation ci-dessus avec un rinçage en présence de 0,1 x SSC, 0,1 % SDS, pendant 2 heures à 65°C afin d'éliminer les clones non spécifiques de l'ADNc de PAP humaine ayant cependant hybridé avec l'ADNc de PAP de rat et
- la récupération des clones n'ayant pas hybridé avec l'ADNc PSP,
- la récupération des fragments ADNc des clones positifs obtenus.

2. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de criblage avec l'ADNc PSP est suivie d'une étape de criblage avec l'ADNc de PAP de rat, dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhardt, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg d'ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C, suivi d'un rinçage pendant 2 heures à 65°C.

3. Fragment d'ADNc de la PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il répond à la séquence S3 suivante :

ATG CTG

CCT CCC ATG GCC CTG CCC AGT GTA TCT TGG ATG CTG CTT
TCC TGC CTC ATG CTG CTG TCT CAG GTT CAA GGT GAA GAA
CCC CAG AGG GAA CTG CCC TCT GCA CGG ATC CGC TGT CCC
AAA GGC TCC AAG GCC TAT GGC TCC CAC TGC TAT GCC TTG
TTT TTG TCA CCA AAA TCC TGG ACA GAT GCA GAT CTG GCC
TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAC CTG GTG TCT GTG CTC
AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG AAG
AGC ATT GGT AAC AGC TAC TCA TAC GTC TGG ATT GGG CTC
CAT GAC CCC ACA CAG GGC ACC GAG CCC AAT GGA GAA GGT
TGG GAG TGG AGT AGC AGT GAT GTG ATG AAT TAC TTT GCA
TGG GAG AGA AAT CCC TCC ACC ATC TCA AGC CCC GGC CAC
TGT GCG AGC CTG TCG AGA AGC ACA GCA TTT CTG AGG TGG
AAA GAT TAT AAC TGT AAT GTG AGG TTA CCC TAT GTC TGC
AAA GTT CAC

4. Fragment d'ADNc de la PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il code pour l'enchaînement d'acides aminés A3 suivant :

Met Leu

Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu
 Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu
 Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro
 Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu
 Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala
 Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu
 Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys
 Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu
 His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly
 Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala
 Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His
 Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp
 Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys
 Lys Val His

5. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique présentant une homologie d'au moins 60 %, de préférence d'au moins 70 % avec au moins un enchaînement d'environ 100 nucléotides, compris dans la séquence S2 suivante caractéristique de l'ADNc de la PAP mature de rat, ou dans la séquence S3 caractéristique d'un fragment d'ADNc de PAP humaine.

Séquence S2 :

GAAGACT	CTCCGAAGAA	AATACCCCTCT	GCACGCATTA	GTTGCCCCCAA	AGGCTCCCCAG
70	80	90	100	110	120
GCATATGGCT	CCTACTGCTA	TGCCCCGTGTT	CAGATACCAC	AGACCTGGTT	TGATGCAGAA
130	140	150	160	170	180
CTGGCCTGCC	AGAAGAGACC	TGAAGGACAC	CTTGTAATCTG	TGCTCAATGT	AGCTGAAGCT
190	200	210	220	230	240
TCATTCTTGG	CATCCATGGT	CAAGAACACT	GGAAACAGCT	ACCAATATAC	CTGGATTGGA
250	260	270	280	290	300
CTCCATGACC	CCACTCTTGG	TGGAGAACCC	AATGGAGGTG	GATGGAGTG	GAGTAACAAT
310	320	330	340	350	360
GACATAATGA	ATTATGTCAA	CTGGGAGAGG	AACCCATCTA	CTGCCCTTAGA	CCGCGGATTC
370	380	390	400	410	420
TGTGGCAGCT	TGTCAAGATC	TTCTGGATT	CTAAGATGGA	GAGATACCAC	ATGTGAAGTT
430	440	450	460	470	480
GAAGTTGCC	TACGTCTGCA	AATTACAGG	TTAAATATAC	CAGACAGCAA	ACAGCTT

6. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est capable d'hybrider avec la séquence nucléotidique S1 suivante caractéristique de l'ADNc de la PAP de rat, et/ou avec la séquence nucléotidique S2 caractéristique de l'ADNc de la PAP de rat mature dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, pendant 18 heures à 68°C et avec un rinçage dans une solution comprenant 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois pendant 15 minutes à 65°C.

Séquence s 1 :

AAAACCATCC	10	AAATCGCCCG	20	CAAGACAGCT	30	AAGGAGGAGC	40	AGAAAGATGA	50	TGAGAGTTAA	60
TATGTTGCAT	70	CGCTTGGCCT	80	TCCCAGTCAT	90	GTCCTGGATG	100	CTGCTCTCCT	110	GCCTGATGCT	120
CTTATCACAG	130	GTGCAAGGAG	140	AAGACTCTCC	150	GAAGAAATA	160	CCCTCTGCAC	170	GCATTAGTTG	180
CCCCAAAGGC	190	TCCCAGGCAT	200	ATGGCTCCTA	210	CTGCTATGCC	220	CTGTTTCAGA	230	TACCACAGAC	240
CTGGTTTGAT	250	GCAGAACTGG	260	CCTGCCAGAA	270	GAGACCTGAA	280	GGACACCTTG	290	TATCTGTGCT	300
CAATGTAGCT	310	GAAGCTTCAT	320	TCTTGGCATC	330	CATGGTCAAG	340	AACACTGAA	350	ACAGCTACCA	360
ATATACCTGG	370	ATTGGACTCC	380	ATGACCCAC	390	TCTTGGTGG	400	GAACCCAATG	410	GAGGTGGATG	420
GGAGTGGAGT	430	AACAATGACA	440	TAATGAATTA	450	TGTCAACTGG	460	GAGAGGAACC	470	CATCTACTGC	480
CTTAGACCCG	490	GGATTCTGTG	500	GCAGCTTGTC	510	AAGATCTTCT	520	GGATTCTAA	530	GATGGAGAGA	540
TACCACATGT	550	GAAGTTGAAG	560	TTGCCCTACG	570	TCTGCAAAAT	580	TACAGGTAA	590	AATTACCAGA	600
CAGCAAAACAG	610	CTTAGTTTG	620	TCCCTGAAGCA	630	CATCCTGTCA	640	AGGGGCAAAA	650	TATGAAGACT	660
TGCGTAGAAA	670	AAGTGATTC	680	TATCTACAGT	690	CCATATTGGA	700	GCTCTAATCA	710	TTCTTTAGCC	720
AATTTTGAT	730	AAGTTGTGTC	740	CTCATGTCTT	750	GGAAGCAGT	760	AATAAACCTC	770	AGTCTCTCTT	780
CGAAAAAAA	790	AAA	800	810	820	830	840				

7. Fragment d'ADNc caractéristique d'une protéine PAP humaine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique suivante:

10 20 30 40 50 60
TTTGTTAAGG ATTCCCTTGA GAATTATGTA AAAGTTTAC AAGAGTCCAT CTCATTCTCT
70 80 90 100 110 120
TTGTCCCCCT CAAAGCTGGC TTGCCAGAAG CGGCCCTCTG GAAAACTGGT GTCTGTGCTC
130 140 150 160 170 180
AGTGGGGCTG AGGGATCCTT CGTGTCTCTCC CTGGTGAGGA GCATTAGTAA CAGCTACTCA
190 200 210 220 230 240
TACATCTGGA TTGGGCTCCA TGACCCCAACA CAGGTGCGAG TATATCCTCC CCTCTCTGTT
250 260 270 280 290 300
ACCTCTCAAG GTACTGTTGT TGCCCAGGCG CACTCCCTGT CCCCAGTCCC TGCCCCAGGAA

GTACTT

8. Fragment d'ADNc caractérisé en ce qu'il répond à la séquence nucléotidique S1 codant pour la protéine PAP de rat, à une partie ou à une variante de cette séquence dès lors que cette partie ou variante code pour une protéine ou un peptide reconnu par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat ou qu'elle hybride avec la séquence S1 dans une solution d'hybridation contenant 6 x SSC, 5 x Denhart, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA, 200 µg ADN de sperme de saumon, 18 heures à 68°C et après un rinçage dans les conditions suivantes : 6 x SSC, 0,1 % SDS, 2 fois 15 minutes à 65°C.

9. Fragment d'ADNc caractérisé en ce qu'il code pour une protéine répondant à l'une des séquences d'acides aminés A1 ou A2 suivantes, ou pour une séquence d'acides aminés ayant une homologie de 40 à 80 % de préférence de 50 à 60 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés des séquences A1 ou A2, ou dans la séquence A3 de la protéine PAP humaine.

A1

MetLeuHisArgLeuAlaPheProValMetSerTrpMetLeuLeuSerCysLeuMetLeuLeuSerGlnValGln
GlyGluAspSerProLysLysIleProSerAlaArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr
CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis
LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln
TyrThrTrpIleGlyLeuHisAspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyGlyTrpGluTrpSerAsnAsn
AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer
ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg
LeuLysLeuProaspSerLysGlnLeu

34

A2

GluAspSerProLysLysIleProSerAlaAArgIleSerCysProLysGlySerGlnAlaTyrGlySerTyr

CysTyrAlaLeuPheGlnIleProGlnThrTrpPheAspAlaGluLeuAlaCysGlnLysArgProGluGlyHis

LeuValSerValLeuAsnValAlaGluAlaSerPheLeuAlaSerMetValLysAsnThrGlyAsnSerTyrGln

35

TyrThrTrpIleGlyLeuHisAspProThrLeuGlyGlyGluProAsnGlyGlyGlyTrpGluTrpSerAsnAsn

AspIleMetAsnTyrValAsnTrpGluArgAsnProSerThrAlaLeuAspArgGlyPheCysGlySerLeuSer

ArgSerSerGlyPheLeuArgTrpArgAspThrThrCysGluValGluValAlaLeuArgLeuGlnIleTyrArg

LeuLysLeuProAspSerLysGlnLeu

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10. Fragment d'acide nucléique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'ADN complémentaire du fragment d'ADNc selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou encore en ce qu'il s'agit du fragment d'ARN correspondant à cet ADNc.

11. Protéine PAP humaine, telle qu'obtenue par l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, tel qu'obtenu selon la revendication 1 ou la revendication 2, au moyen d'un système d'expression adapté, par exemple un hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression, lui-même modifié par l'insertion du susdit fragment d'ADNc de la PAP humaine.

12. Protéine PAP humaine selon la revendication 11, telle qu'obtenue par l'expression d'un fragment d'ADNc de la PAP humaine, inséré en phase dans un vecteur pEX, dans E.coli, notamment dans E.coli souche pop2136.

13. Protéine PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés A3.

14. Protéine PAP humaine selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement d'acides aminés suivant :

Phe Val Lys Asp Ser Leu Glu Asn Tyr Val Lys Val Leu	39
	13
Gln Glu Ser Ile Ser Phe Ser Leu Ser Pro Ser Lys Leu	78
	26
Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val	117
	39
Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val	156
	52
Arg Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly	195
	65
Leu His Asp Pro Thr Gln Val Arg Val Tyr Pro Pro Leu	234
	78
Ser Val Thr Ser Gln Gly Thr Val Val Ala Gln Ala His	273
	91
Ser Leu Ser Pro Val Pro Ala Gln Glu Val Leu	306
	102

15. Protéine PAP humaine caractérisée en ce que sa séquence d'acides aminés présente une homologie d'au moins 50%, de préférence d'au moins 60% et de façon très préférée d'au moins 70 % avec au moins un enchaînement d'environ 25 acides aminés, compris dans la séquence A2 de la protéine PAP de rat mature ou avec la séquence A3 de la protéine PAP humaine.

16. Protéine PAP de rat caractérisée en ce qu'elle répond à l'enchaînement d'acides aminés suivant, ou une variante ou une partie de cet enchaînement dès lors que cette partie ou cette variante est reconnue par des anticorps dirigés contre la protéine PAP de rat ou qu'elle présente une homologie d'au moins 50 %, de préférence d'au moins 60% avec la séquence A2 de PAP de rat.

17. Anticorps caractérisés en ce qu'ils reconnaissent la protéine PAP humaine selon l'une

quelconque des revendications 11 à 15 et en ce qu'il s'agit d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

18. Anticorps monoclonaux tels qu'obtenus à partir d'un hybridome, précédemment formé par fusion d'une cellule de myélome et d'une cellule splénique d'un animal préalablement immunisé avec une protéine selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

19. Anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement la partie NH₂ - terminale de l'enchaînement d'acides aminés A3.

20. Anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre le peptide Glu Glu Pro Gln Arg.

21. Hybridome tel qu'obtenu à partir de la fusion d'une cellule de myélome avec une cellule splénique d'un animal préalablement immunisé avec une protéine PAP humaine selon l'une quelconque des revendications 11 à 15.

22. Vecteur d'expression et/ou de clonage caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

23. Hôte cellulaire transformé par un vecteur d'expression selon la revendication 22, dans des conditions permettant l'obtention de la protéine ou du peptide codé par le fragment d'ADN inséré dans le vecteur, ledit hôte cellulaire étant par exemple choisi parmi les bactéries, notamment en ce qu'il s'agit de E.coli, parmi les levures, les cellules d'insectes ou de mammifères.

24. Produit d'expression de l'hôte cellulaire transformé selon la revendication 23.

25. Composition pour le diagnostic in vitro de la pancréatite aiguë ou pour l'observation de la glande

pancréatique en imagerie médicale, dans un échantillon biologique tel que le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 17 à 19 le cas échéant marqué, capable de former un complexe du type anticorps-antigène avec la protéine PAP humaine.

26. Kit pour le diagnostic in vitro de la pancréatite aiguë, à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend:

- au moins un anticorps selon l'une quelconque des revendications 17 à 20 capable de détecter la présence de la PAP humaine dans ledit échantillon biologique, lesdits anticorps étant le cas échéant marqués,
- selon la nature du marquage, un réactif pour détecter la présence d'un complexe du type antigène-anticorps spécifique,
- un témoin négatif.

27. Procédé pour détecter in vitro une pancréatite aiguë, à partir d'un échantillon biologique comprenant les étapes de:

- mise en contact de l'échantillon biologique susceptible de contenir la PAP humaine, avec des anticorps selon l'une quelconque des revendications 17 à 20,
- détection de la réaction antigène-anticorps entre les susdits anticorps et la PAP humaine.

28. Procédé d'observation de la glande pancréatique caractérisé par :

- l'injection à un patient d'une composition selon la revendication 25, dans des conditions physiologiquement acceptables,
- l'observation notamment par les techniques d'imagerie médicale d'une réaction entre les anticorps contenus

40

dans la susdite composition et la PAP humaine
lorsqu'elle est présente.

1/4

**EXPRESSION DES ARNm AMYLASE ET PAP AU COURS
DE LA PANCREATITE AIGUE EXPERIMENTALE DU RAT**

PAP



A

AM



B

0 0.5 1 2 5 10

↑
INDUCTION

JOURS

FIGURE 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/4

AAAACCATCCAAATCGCCCGCAAGACAGCTAAGGAGGAGCAGAAAAGATGATG	52
AGAGTTAAT ATG TTG CAT CGC TTG GCC TTC CCA GTC ATG Met Leu His Arg Leu Ala Phe Pro Val Met	91
TCC TGG ATG CTG CTC TCC TGC CTG ATG CTC TTA TCA CAG Ser Trp Met Leu Leu Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln	130
GTG CAA GGA GAA GAC TCT CCG AAG AAA ATA CCC TCT GCA Val Gln Gly Glu Asp Ser Pro Lys Lys Ile Pro Ser Ala	169
CGC ATT AGT TGC CCC AAA GGC TCC CAG GCA TAT GGC TCC Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Gln Ala Tyr Gly Ser	208
TAC TGC TAT GCC CTG TTT CAG ATA CCA CAG ACC TGG TTT Tyr Cys Tyr Ala Leu Phe Gln Ile Pro Gln Thr Trp Phe	247
GAT GCA GAA CTG GCC TGC CAG AAG AGA CCT GAA GGA CAC Asp Ala Glu Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Glu Gly His	286
CTT GTA TCT GTG CTC AAT GTA GCT GAA GCT TCA TTC TTG Leu Val Ser Val Leu Asn Val Ala Glu Ala Ser Phe Leu	325
GCA TCC ATG GTC AAG AAC ACT GGA AAC AGC TAC CAA TAT Ala Ser Met Val Lys Asn Thr Gly Asn Ser Tyr Gln Tyr	364
ACC TGG ATT GGA CTC CAT GAC CCC ACT CTT GGT GGA GAA Thr Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu	403
CCC AAT GGA GGT GGA TGG GAG TGG AGT AAC AAT GAC ATA Pro Asn Gly Gly Gly Trp Glu Trp Ser Asn Asn Asp Ile	442
ATG AAT TAT GTC AAC TGG GAG AGG AAC CCA TCT ACT GCC Met Asn Tyr Val Asn Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ala	481
TTA GAC CGC GGA TTC TGT GGC AGC TTG TCA AGA TCT TCT Leu Asp Arg Gly Phe Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser	520
GGA TTT CTA AGA TGG AGA GAT ACC ACA TGT GAA GTT GAA Gly Phe Leu Arg Trp Arg Asp Thr Thr Cys Glu Val Glu	559
GTT GCC CTA CGT CTG CAA ATT TAC AGG TTA AAA TTA CCA Val Ala Leu Arg Leu Gln Ile Tyr Arg Leu Lys Leu Pro	598
GAC AGC AAA CAG CTT T AGTTTGTCTGAAGCACATCCTGTCAAGGG Asp Ser Lys Gln Leu	644
GCAAAATATGAAGACTTGCGTAGAAAAAGTGTATTCTATCTACAGTCCATAT	696
TGGAGCTCTAATCATTCTTTAGCCAATTTTGTATAAGTTGTGTCTCATGTC	748
TTGGAAAGCAGTAATAAACCTCAGTCTCTCTTCGAAAAAAAAAAAAA	793

Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3/4

TTT GTT AAG GAT TCC CTT GAG AAT TAT GTA AAA GTT TTA	39
Phe Val Lys Asp Ser Leu Glu Asn Tyr Val Lys Val Leu	13
CAA GAG TCC ATC TCA TTC TCT TTG TCC CCC TCA AAG CTG	78
Gln Glu Ser Ile Ser Phe Ser Leu Ser Pro Ser Lys Leu	26
GCT TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAA CTG GTG TCT GTG	117
Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val	39
CTC AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG	156
Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val	52
AGG AGC ATT AGT AAC AGC TAC TCA TAC ATC TGG ATT GGG	195
Arg Ser Ile Ser Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly	65
CTC CAT GAC CCC ACA CAG GTG CGA GTA TAT CCT CCC CTC	234
Leu His Asp Pro Thr Gln Val Arg Val Tyr Pro Pro Leu	78
TCT GTT ACC TCT CAA GGT ACT GTT GTT GCC CAG GCG CAC	273
Ser Val Thr Ser Gln Gly Thr Val Val Ala Gln Ala His	91
TCC CTG TCC CCA GTC CCT GCC CAG GAA GTA CTT	306
Ser Leu Ser Pro Val Pro Ala Gln Glu Val Leu	102

Figure 3

4/4

cgggagagtgactcctgattgcctcctcaagtcgcagacact	ATG CTG	48
	Met Leu	2
CCT CCC ATG GCC CTG CCC AGT GTA TCT TGG ATG CTG CTT		87
Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu		15
TCC TGC CTC ATG CTG CTG TCT CAG GTT CAA GGT GAA GAA		126
Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu		28
CCC CAG AGG GAA CTG CCC TCT GCA CGG ATC CGC TGT CCC		165
Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro		41
AAA GGC TCC AAG GCC TAT GGC TCC CAC TGC TAT GCC TTG		204
Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu		54
TTT TTG TCA CCA AAA TCC TGG ACA GAT GCA GAT CTG GCC		243
Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala		67
TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAC CTG GTG TCT GTG CTC		282
Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu		80
AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG AAG		321
Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys		93
AGC ATT GGT AAC AGC TAC TCA TAC GTC TGG ATT GGG CTC		360
Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu		106
CAT GAC CCC ACA CAG GGC ACC GAG CCC AAT GGA GAA GGT		399
His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly		119
TGG GAG TGG AGT AGC AGT GAT GTG ATG AAT TAC TTT GCA		438
Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala		132
TGG GAG AGA AAT CCC TCC ACC ATC TCA AGC CCC GGC CAC		477
Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His		145
TGT GCG AGC CTG TCG AGA AGC ACA GCA TTT CTG AGG TGG		516
Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp		158
AAA GAT TAT AAC TGT AAT GTG AGG TTA CCC TAT GTC TGC		555
Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys		171
AAA GTT CAC tgactagtgcaggagggaagtcagcagcctgtgtttggt		603
Lys Val His		174
gtgcaactcatcatgggcatgagaccagtgtgaggactcaccctggaagaga		655
atattcgcttaattcccccaacctgaccacctcattcttatctttcttctgt		707
ttcttctctccccgctagtcatttcagtcctcttcattttgtcatacggcctaa		759
ggcttttaagagcaataaaaatttttagtctgcaaaaaaa		798

FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00323

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> Int.Cl.⁵ C12N15/12; A61K49/00; G01N33/577 </div>											
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 5px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C12N; C07N</td> </tr> </table> <div style="margin-top: 5px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	C12N; C07N					
Classification System	Classification Symbols										
Int.Cl. ⁵	C12N; C07N										
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P,X</td> <td style="padding: 5px;"> GASTROENTEROLOGY Vol. 100 No. 3, March 1991 pages 755 - 782; KEIM, V. et al.: "Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis" see the whole document <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">--</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">16</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P,X</td> <td style="padding: 5px;"> GASTROENTEROLOGY Vol. 98, No. 5pt2, May 1990, page A220 IOVANNA, J. et al.: "Rat Pancreatitis-Associated Protein (PAP) messenger RNA, nucleotide sequence and expression during acute experimental pancreatitis" see abstract <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">--</div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">-./.</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">8, 16</td> </tr> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	P,X	GASTROENTEROLOGY Vol. 100 No. 3, March 1991 pages 755 - 782; KEIM, V. et al.: "Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis" see the whole document <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">--</div>	16	P,X	GASTROENTEROLOGY Vol. 98, No. 5pt2, May 1990, page A220 IOVANNA, J. et al.: "Rat Pancreatitis-Associated Protein (PAP) messenger RNA, nucleotide sequence and expression during acute experimental pancreatitis" see abstract <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">--</div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">-./.</div>	8, 16
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³									
P,X	GASTROENTEROLOGY Vol. 100 No. 3, March 1991 pages 755 - 782; KEIM, V. et al.: "Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis" see the whole document <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">--</div>	16									
P,X	GASTROENTEROLOGY Vol. 98, No. 5pt2, May 1990, page A220 IOVANNA, J. et al.: "Rat Pancreatitis-Associated Protein (PAP) messenger RNA, nucleotide sequence and expression during acute experimental pancreatitis" see abstract <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">--</div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">-./.</div>	8, 16									
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>											
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 22 July 1991 (22.07.91) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 14 August 1991 (14.08.91) </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> International Searching Authority European Patent Office </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 22 July 1991 (22.07.91)	Date of Mailing of this International Search Report 14 August 1991 (14.08.91)	International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer					
Date of the Actual Completion of the International Search 22 July 1991 (22.07.91)	Date of Mailing of this International Search Report 14 August 1991 (14.08.91)										
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer										

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	<p>DIGESTION Vol. 31, No. 3, 25 September 1985, page 191 KEIM, V. et al.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein and bile acid induced ex" see abstract 74</p> <p style="text-align: center;">---</p>	16
X	<p>DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES Vol. 30, No. 10, October 1985 page 977 KEIM, V. & ROHR, G.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein- and bile acid-induced p" see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	16
X	<p>DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES Vol. 30, No. 10, October 1985, page 988 ROHR, G. et al.: "Appearance of Pancreatitis Associated Protein (PAP) in taurocholate pancreatitis in the rat demonstrate by immuno-histology and immuno- electromicroscopy" see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	16
X	<p>DIGESTION Vol. 29, 1984 pages 242 - 249; KEIM, V. et al.: "An additional secretory protein in the rate pancreas" see the whole document (cited in the application)</p> <p style="text-align: center;">---</p>	16
X	<p>CLIN. PHYSIOL. BIOCHEM. Vol. 4, 1986 pages 136 - 142; KEIM, V.: "Pancreatitis-associated protein in bile acid-induced pancreatitis of the rat" see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 91/00323

I. CLASSIFICATION DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> CIB 5 C12N15/12 ; A61K49/00 ; G01N33/577 </div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	N° des revendications visées ¹⁴
P, X	GASTROENTEROLOGY vol. 100, no. 3, mars 1991, pages 775 - 782; KEIM, V. et al.: "Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis" voir le document en entier ---	16
P, X	GASTROENTEROLOGY vol. 98, no. 5pt2, mai 1990, page A220 IOVANNA, J. et al.: "Rat Pancreatitis-Associated Protein (PAP) messenger RNA, nucleotide sequence and expression during acute experimental pancreatitis" voir abrégé --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	8, 16
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹¹ Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"L" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"T" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
22 JUILLET 1991	14. 08. 91	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	CHAMBONNET F. J.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸	
X	DIGESTION vol. 32, no. 3, 25 septembre 1985, page 191 KEIM, V et al.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein and bile acid induced ex" voir abrégé 74 ---	16	
X	DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES vol. 30, no. 10, octobre 1985, page 977 KEIM, V. & ROHR,, G.: "Pancreatitis-Associated Protein (PAP) in cerulein- and bile acid-induced p" voir abrégé ---	16	
X	DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES vol. 30, no. 10, octobre 1985, page 988 ROHR, G. et al.: "Appearance of Pancreatitis Associated Protein (PAP) in taurocholate pancreatitis in the rat demonstrated by immuno-histology and immuno-elec tronmicroscopy" voir abrégé ---	16	
X	DIGESTION vol. 29, 1984, pages 242 - 249; KEIM, V. et al.: "An additional secretory protein in the rate pancreas" voir le document en entier (cité dans la demande) ---	16	
X	CLIN. PHYSIOL. BIOCHEM. vol. 4, 1986, pages 136 - 142; KEIM, V.: "Pancreatitis-associated protein in bile acid-induced pancreatitis of the rat" voir le document en entier ---	16	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.